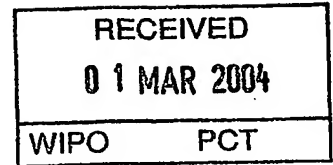


Helsinki 9.2.2004

Rec'd PCT/PTO 19 MAY 2005
PCT / F I O 0 0 8 8 8

#2

ETUOIKEUSTODISTUS
PRIORITY DOCUMENT



Hakija
Applicant

Mobidiag Oy
Helsinki

Patenttihakemus nro
Patent application no

20022064

Tekemispäivä
Filing date

19.11.2002

Kansainvälinen luokka
International class

C12Q

Keksinnön nimitys
Title of invention

"Nukleiinihappokoettimia, universaaleja alukkeita ja menetelmiä, joissa niitä käytetään"

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä Patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä, patenttivaatimuksista, tiivistelmästä ja piirustuksista.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the description, claims, abstract and drawings originally filed with the Finnish Patent Office.

Marketta Tehlikoski
Apulastarkastaja

Maksu 50 €
Fee 50 EUR

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Maksu perustuu kauppa- ja teollisuusministeriön antamaan asetukseen 1027/2001 Patentti- ja rekisterihallituksen maksullisista suoritteista muutoksineen.

The fee is based on the Decree with amendments of the Ministry of Trade and Industry No. 1027/2001 concerning the chargeable services of the National Board of Patents and Registration of Finland.

Osoite: Arkadiankatu 6 A Puhelin: 09 6939 500 Telefax: 09 6939 5328
P.O.Box 1160 Telephone: + 358 9 6939 500 Telefax: + 358 9 6939 5328
FIN-00101 Helsinki, FINLAND

BEST AVAILABLE COPY

Nukleiinihappokoettimia, universaaleja alukkeita ja menetelmiä, joissa niitä käytetään

Keksinnön ala

- Keksintö koskee nukleiinihappokoettimia ja universaaleja alukkeita, jotka ovat käyttökelpoisia bakteerien tunnistamisessa ja bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosoimisessa. Erityisesti keksintö koskee spesifisiä nukleiinihappokoettimia, jotka ovat peräisin infektoita aiheuttavien bakteerien toposomeraasigeenin konservoituneiden alueiden lähellä olevilta hypervarioivilta alueilta. Keksintö koskee myös universaaleja alukkeita, jotka ovat peräisin toposomeraasigeenin konservoituneilta alueilta. Lisäksi keksintö koskee näiden nukleiinihappokoettimien ja universaalien alukkeiden käyttöä bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosoinnissa sekä diagnostisia menetelmiä, joissa käytetään näitä nukleiinihappokoettimia ja universaaleja alukkeita.

Keksinnön tausta

- Hengitystieinfektiot ovat yleisin syy lääkärin vastaanotolla käyntiin. Suomessa todetaan vuosittain noin 13 keuhkokuumeetapausta 1 000 asukasta kohden ja akuutteja poskiontelo- ja korvatulehduksia diagnosoidaan vielä huomattavasti enemmän. Esimerkiksi korvatulehduksia todetaan Suomessa vuodessa arviolta noin 200 000 tapausta (pääasiassa lapsilla). Hengitystieinfektiot kuormittavat terveydenhuoltoa ja aiheuttavat yhteiskunnalle mittavat kustannukset, joiden tarkempi laskeminen on vaikeaa, sillä suurin osa kustannuksista koostuu ns. epäsuorista kustannuksista, kuten työstä poissaolosta [Rautakorpi ym., Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 33(12): 920 - 926, 2001; Infektiotaudit, toim. Eskola, Huovinen ja Valtonen 1998]. Maailmanlaajuisesti hengitystieinfektiot aiheuttavat vuosittain useiden miljoonien ihmisten, pääasiassa lasten, kuoleman.

- Hengitystieinfektioita aiheuttaa virusten lisäksi suuri joukko erilaisia bakteereja. *Streptococcus pyogenes* (A-ryhmän streptokokki) on tärkeä nielurisatulehduksen, tonsilliitin, aiheuttaja. Sen aiheuttamaan hoitamattomaan tonsilliittiin liittyy vakavien komplikaatioiden, kuten peritonsillaarisen absessin, riski. Lisäksi *S. pyogenes* tonsilliittien jälkitauteina voi esiintyä reumakuumetta ja glomerulonefriittiä, jotka molemmat ovat vakavia, jopa potilaan henkeä uhkavia tauteja. Avohoito keuhkokuumeiden tärkeimpiä taudinaiheuttajia ovat virusten lisäksi *Streptococcus pneumoniae* (pneumokokki), *Mycoplasma pneumoniae* ja *Chlamydia pneumoniae*, joista pneumokokki on yleisin ja vakavin

keuhkokuumeen aiheuttaja. Harvinaisempia keuhkokuumetta aiheuttavia bakteereja ovat *Legionella pneumophila* ja *Coxiella burnetii*. *Mycobacterium tuberculosis* –bakteeri puolestaan aiheuttaa keuhkotuberkuloosia. Immuunivajavai-
 5 silla potilailla todetaan lisäksi harvinaisten *Mycobacterium*- ja *Nocardia*-suvun bakteerien aiheuttamia keuhkotulehduksia. Poskiontelotulehduksen (sinuiitti) ja välikorvatulehduksen (otitis media) aiheuttajia ovat pneumokokin lisäksi mm. *Haemophilus influenzae* ja *Moraxella catarrhalis*. Muista otiitin aiheuttajista mainittakoon hieman harvinaisempi *Alloiococcus otitidis*.

Tällä hetkellä hengitystieinfektioiden diagnostiikka on bakteerien
 10 osalta pääasiassa bakteeriviljelyn varassa. Bakteerien viljeleminen on kuitenkin suhteellisen hidasta ja viljelyyn perustuvat diagnostiset menetelmät antavat tuloksia yleensä vasta vuorokausien, joskus jopa viikkojen kuluttua näytteen otosta. Bakteerien viljely ei myöskään aina onnistu laboratorio-olosuhteissa. Tämä voi johtua joko siitä, että käytetty viljelymenetelmä ei ole kyseiselle bak-
 15 teerille soveltuva tai siitä, että potilaalle on ennen näytteen ottamista annettu antibioottihoitoa. Nielutulehdusten diagnostiikassa antigeenin osoitukseen perustuvat pikamenetelmät ovat hyviä bakteeriviljelyä täydentäviä menetelmiä, mutta niiden ongelmana on suppea lajivalikoima (A-ryhmän streptokokki). Joi-
 20 denkin bakteeri-infektioiden (esim. *C. pneumoniae* ja *M. pneumoniae*) diagnostiikassa voidaan käyttää myös serologisia menetelmiä, mutta nämä menetelmät antavat tuloksia vasta useita viikkoja infektion alkamisen jälkeen eivätkä näin ollen auta potilaan akuutissa hoidossa.

Molekylaariset nukleiinihappojen monistamiseen ja hybridisaatioon perustuvat menetelmät pyrkivät ratkaisemaan edellä kuvatut bakteeriviljelyyn
 25 liittyvät ongelmat. Niiden avulla bakteeri todetaan ja tunnistetaan samanaikaisesti, mikä nopeuttaa diagnostiikkaa, eikä aikaa vieviä jatkoviljelyjä tarvita. Antibiootit eivät myöskään häiritse molekylaarisia menetelmiä samassa määrin kuin bakteeriviljelyä.

Eräs bakteeridiagnostiikassa käytetyistä molekylaarisista menetel-
 30 mistä on ns. yleis-bakteeri-PCR, joka perustuu ns. universaalien alukkeiden käyttöön. Tällä hetkellä käytössä olevissa yleis-bakteeri-PCR-menetelmissä käytetään ribosomaalista RNA:ta (16S rDNA/rRNA tai 23S rDNA/rRNA) koo-
 daavien geenien konservoituneille DNA-alueille sijoittuvia alukkeita. Yleis-
 bakteeri-PCR:ään perustuvassa bakteerien tunnistuksessa varsinainen tunnis-
 35 tusvaihe toteutetaan kloonaamalla ja sekvensoimalla saatu PCR-tuote. (Katso

esim. EP-patentti 613 502, US-patentti 6 001 564 ja US-patenttihakemus 0 020 055 101).

Yleis-bakteeri-PCR-menetelmää on jonkin verran sovellettu kliiniseen bakteeridiagnostiikkaan, vaikka se soveltuukin parhaiten bakteeri- ja sienilajien tunnistukseen puhdasviljelmistä, ja tähän tarkoitukseen on kehitelty myös kaupallisia testejä kuten esim. MicroSeq, (Applied Biosystems). Nämä testit eivät kuitenkaan ole laajalti käytössä, sillä PCR-tuotteen kloonauksen ja sekvensointi on hidasta ja työlästä ja itse testit ja niiden käyttöön tarvittavat laitteistot, kuten esim. sekvensointilaitteet, ovat kalliita ja testien suorittaminen vaatii koulutettua henkilökuntaa.

Toinen bakteeridiagnostiikassa jonkin verran käytetty menetelmä on spesifisiin oligonukleotideihin perustuva multiplex-PCR-menetelmä. Tässä menetelmässä monistamiseen käytetään universaalien ja bakteerilajispesifisten alukkeiden seosta. Hendolin et al. (Journal of Clinical Microbiology, 35: 11, 1997) käyttivät multiplex-PCR-menetelmää välikorvantulehdusta aiheuttavien bakteerien tunnistukseen. Kyseisessä menetelmässä käytetään toisena PCR-alukkeena universaalia, 16S-rRNA:n konservoituneelle geenialueelle sijoitettavaa aluketta ja toisena PCR-alukkeena alukeseosta, joka koostuu neljälle eri bakteerilajille spesifisistä alukkeista. Bakteerilajispesifiset alukkeet on suunniteltu siten, että aikaansaatu PCR-tuote on eripituinen riippuen siitä, mistä bakteerilajista se on peräisin, jolloin tunnistus perustuu syntyvän PCR-tuotteen pituuteen. Vaikka multiplex-PCR menetelmä onkin suhteellisen herkkä ja nopea, menetelmällä on haittapuolia. Tiedetään, että lyhyemmät DNA-jaksot monistuvat tehokkaammin kuin pidemmät jaksot. Jos siis samassa näytteessä on kah- ta bakteeria, monistuu lyhyemmän tuotteen antavan bakteerin DNA todennäköisesti tehokkaammin, mikä vaikuttaa menetelmän herkkyyteen. Lisäksi multiplex-PCR-menetelmällä pystytään samanaikaisesti tunnistamaan vain muutamia bakteerilajeja, sillä käytännössä on mahdotonta suunnitella kymmeniä spesifisiä PCR-alukkeita siten, että ne toimisivat samoissa PCR-olosuhteissa ja että syntyvät PCR-tuotteet eroaisivat pituudeltaan riittävästi toisistaan. Multiplex-PCR ei siis sovellu esim. hengitystieinfektiodiagnostiikkaan, jossa kliinisesti tärkeitä taudinaiheuttajia tunnetaan toista kymmentä.

Ns. normaaliflooran bakteerit voivat myöskin häiritä multiplex-PCR:ään perustuvaa diagnostiikkaa. Vasta muutamien kymmenien bakteerilajien perimä on kokonaisuudessaan kartoitettu ja suurin osa näistä kartoitetuista lajeista on tunnettuja taudinaiheuttajia. Normaaliflooran bakteereista ja

niiden DNA-sekvensseistä on siis vielä hyvin vähän tietoa. Tämän vuoksi bakteerilajispesifisten PCR-alukkeiden suunnittelu ja pelkkään PCR-monistukseen perustuva diagnosointi onkin lähes mahdotonta.

Myös ribosomaalisen RNA:n käyttöön liittyy ongelmia. Lähisukuisten bakteerilajien erottaminen toisistaan rRNA-molekyylien avulla on vaikeaa, koska näiden molekyylien sekvensseihin ei evoluution aikana ole kertynyt riittävästi eroja. Ja vaikka lajien välisiä eroja löytyisikin, nämä varioivat kohdat ovat yleensä jakautuneet koko rRNA-molekyylin alueelle (esim. 16S rRNA:n pituus on noin 1500 emästä), mikä rajoittaa diagnostiikassa hyödynnettävien molekyylien menetelmien käyttöä. Käytännössä lähisukuiset bakteerit voidaan siis erotella toisistaan vain sekvensoimalla koko rRNA:ta koodaava geeni, mikä ei sekään aina välttämättä riitä erottamaan lajeja toisistaan.

Keksinnön lyhyt selostus

Esillä oleva keksinnön tarkoituksena on antaa käyttöön välineitä ja keinoja, jotka ovat käyttökelpoisia infektioita aiheuttavien, erityisesti hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerien diagnostiikassa, mutta joilla ei ole edellä kuvattuja bakteerien diagnostiikkaan liittyviä haittoja. Erityisesti keksinnön tarkoituksena on antaa käyttöön uusia molekyyliin menetelmiin perustuvassa bakteeridiagnostiikassa käyttökelpoisia välineitä ja menetelmiä, jotka ovat herkkiä, tehokkaita ja lajispesifisiä ja joiden avulla voidaan tunnistaa vain halutut bakteerit spesifisesti. Keksinnön tarkoituksena on myös antaa käyttöön menetelmiä, joilla infektion aiheuttava, erityisesti hengitystieinfektion aiheuttava bakteeri voidaan diagnosoida oleellisesti aiempaa nopeammin, jolloin potilaalle voidaan määrätä oikea ja tehokas antibioottihoito taudin varhaisemmassa vaiheessa, jolloin taudin kesto lyhenee ja mahdollisten haitallisten, jopa hengenvaarallisten komplikaatioiden riski vähenee.

Esillä oleva keksintö antaa käyttöön bakteerilajispesifisiä oligonukleotidikoettimia, jotka ovat peräisin topoisomeraaseja koodaavien geenien, erityisesti *gyrB/parE*-geenien, konservoituneiden alueiden välisiltä ns. hypervarioivilta alueilta, joilla emäsjärjestys on hyvin erilainen eri bakteerilajeilla. Näiden bakteerilajispesifisten koettimien avulla infektioissa tavattujen bakteerien perimäainesta voidaan paitsi osoittaa myös samanaikaisesti tunnistaa.

Keksintö antaa käyttöön myös universaaleja alukkeita, jotka ovat peräisin topoisomeraaseja koodaavien geenien, erityisesti *gyrB/parE*-geenien, konservoituneilta alueilta ja jotka monistavat tehokkaasti infektioita aiheuttavi-

en bakteereiden DNA:ta myös kliinisistä näytteistä, jotka sisältävät runsaasti vierasta (ei-bakteeriperäistä) DNA:ta.

Lisäksi esillä oleva keksintö antaa käyttöön yksinkertaisia, nopeita, herkkiä ja spesifisiä menetelmiä, joilla olemassa olevan tekniikan mukaisten menetelmien haitat voidaan voittaa. Näillä menetelmillä kliinisesti merkittäviä bakteereja voidaan luotettavasti todeta ja diagnosoida kliinisistä näytteistä tai bakteeriviljelmistä.

Esillä oleva keksintö koskee oligonukleotidikoetinsekvenssejä, jotka hybridisoituvat normaaleissa hybridisaatio-olosuhteissa infektioita, erityisesti hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerien topoisomeraaseja koodaavien geenien konservoituneiden alueiden lähellä olevien hypervarioivien alueiden sekvenssien kanssa ja jotka käsittävät jonkin sekvensseistä sekvenssitunnusnumerot 1 - 69 mukaisen sekvenssin tai sen kanssa käänteisen ja komplementaarisen sekvenssin tai näiden toiminnallisen fragmentin.

Infektioita, erityisesti hengitystieinfektioita, aiheuttavia bakteereja ovat bakteerit *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila* ja *Fusobacterium necrophorum* ja topoisomeraasia koodaava geeni on gyrB- ja/tai parE-proteiinia koodaava geeni,

Edullisesti oligonukleotidikoetinsekvenssin pituus on 15 - 30, edullisemmin 20 - 30 ja edullisimmin 21 - 25 nukleinihappoa.

Esillä oleva keksintö koskee myös edellä mainittujen oligonukleotidikoetinsekvenssien käyttöä bakteerien toteamisessa, tunnistamisessa tai luokittelussa.

Esillä oleva keksintö koskee myös oligonukleotidikoetinseosta, joka sisältää minkä tahansa yhdistelmän, edullisesti kaikki, sekvensseistä, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69, ja/tai näiden kanssa käänteisistä ja komplementaarista sekvensseistä ja/tai näiden toiminnallisista fragmenteista. Eräässä edullisessa suoritusmuodossa haluttu koetinseos on kiinnitetty kiinteälle kantajalle. Edullisesti kiinteälle kantajalle on kiinnitetty oligonukleotidikoetinseos, joka sisältää kaikki sekvenssit, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69 tai näiden kanssa käänteiset ja komplementaariset sekvenssit sekvenssit.

Esillä oleva keksintö koskee myös uutta DNA-alukeseosta, joka sisältää sekvenssejä, jotka hybridisoituvat hengitystieinfektioita aiheuttavien bak-

teerien topoisomeraaseja koodaavien, erityisesti GyrB- ja/tai ParE-proteiinia koodaavien geenien, konservoituneiden alueiden sekvenssien kanssa ja jotka käsittävät sekvenssit tunnusnumero 76 ja 77 mukaiset sekvenssit tai näiden toiminnalliset fragmentit.

5 Esillä oleva keksintö koskee myös mainitun alukeseoksen käyttöä topoisomeraasigeenien, erityisesti GyrB- ja ParE-proteiinia koodaavien geenien, monistamisessa.

Esillä oleva keksintö koskee lisäksi diagnostista menetelmää hengitystieinfektioita aiheuttavan bakteerin osoittamiseksi ja tunnistamiseksi kliinistä näytteestä, jossa menetelmässä

a) kliinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan käyttäen edellä mainittua alukeseosta,

b) monistettu DNA saatetaan kosketukseen halutun yhdistelmän kanssa edellä mainittuja koettimia hybridisaatio-olosuhteissa ja

15 c) todetaan mahdollinen hybridisaatiokompleksin muodostuminen.

Edullisessa keksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa kliinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan polymeraasiketjureaktiota käyttäen ja monistettu DNA saatetaan kosketukseen kiinteälle kantajalle kiinnitettyjen bakteerilajispesifisten oligonukleotidikoettimien kanssa.

20 Eräässä edullisessa keksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa kliinisestä näytteestä eristetyn DNA:n monistuksessa käytetään sopivasti leimattua nukleotidia todettavissa olevan kohdejuosteen aikaansaamiseksi.

Toisessa edullisessa keksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteään kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty kaikki keksinnön mukaiset lajispesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69, tai niiden käänteiset ja komplementaariset sekvenssit.

30 Vielä eräässä edullisessa keksinnön mukaisen menetelmän suoritusmuodossa monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteään kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty keksinnön mukaiset tietyille tai muutamalle hengitystieinfektioita aiheuttavalle bakteerille spesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on vastaavat sekvenssitunnusnumerot taulukoista 4A ja 4B 1 - 7, 30 - 33, 39 - 42 ja 56 - 65, tai niiden komplementaariset sekvenssit tai näiden käänteiset sekvenssit.

Kuvioiden lyhyt selostus

Kuvio 1 esittää esimerkin (*Haemophilus influenzae* ja *Moraxella catharralis*) hypervarioivasta *gyrB*-geenialueesta, joka rajoittuu konservatiivisiin alueisiin. Konservoituneet alueet on merkitty harmailla laatikoilla ja ne toimivat universaalien *gyrB/parE*-alukkeiden kiinnittymiskohtina. Näiden väliin jää hypervarioiva alue, jolle lajispesifiset koettimet on suunniteltu (alleviivatut kohdat).

Kuviossa 2 esitetään esimerkki hybridisaatiotuloksesta koetilasilla. Hybridisoitavana kohdejuosteena oli *S. aureus* -puhdasviljelmästä eristetyt DNA:n *gyrB*-monistuma (epäsymmetrinen Cy-5-dCTP-leimattu PCR-tuote). Esimerkkilasilla oli neljä *S. aureus* bakteerille spesifistä *gyrB*-koetinta (taulukko 4A: oligonukleotidikoettimet 21 - 24), jotka kaikki sitoivat spesifisesti *S. aureus* -kohdejuostetta. Signaalin antoivat lisäksi positiiviset kontrollioligonukleotidit, joita oli lasilla 5 kpl. Muihin lasilla olleisiin oligonukleotideihin *S. aureus* -kohdejuoste ei sitoutunut.

Kuviossa 3 esitetään PCR-monistustulokset esimerkistä 7, jossa verrattiin tunnettuja *Streptococcus pneumoniae*lle spesifisiksi mainittuja alukkeita *Streptococcus*-suvun bakteerien ja *Moraxella catarrhalis*elle spesifisiksi mainittuja alukkeita *Moraxella*-suvun bakteerien testaamiseen. Tulokset osoittavat, etteivät kyseiset alukkeet kuitenkaan ole lajispesifisiä, vaan ne monistavat myös normaaliflooraan bakteereja.

Keksinnön yksityiskohtainen selostus

Esillä oleva keksintö perustuu tutkimuksiin, joissa pyrittiin löytämään spesifisempiä vaihtoehtoja ribosomaalisen RNA:n käytölle infektioita aiheuttavien bakteerien diagnostiikassa. Tutkimus kohdistettiin muihin geeneihin, jotka ovat elintärkeitä bakteereille. Topoisomeraasit gyraasi B (GyrB eli topoisomeraasi II) ja ParE-proteiinit (topoisomeraasi IV:n toinen alayksikkö) ovat bakteerin kannalta tärkeitä molekyyliä, sillä niitä tarvitaan DNA:n pakkaamisessa. Tiedyt alueet näistä molekyyleistä ovat säilyneet evoluution aikana lähes muuttumattomina eli konservoituneet. Tässä yhteydessä termillä "konservoitunut alue" tai "konservoituneet alueet" tarkoitetaan topoisomeraasigeenin tai -proteiinin aluetta tai alueita, joiden emäsjärjestys tai vastaavasti aminohappojärjestys on säilynyt lähes muuttumattomana eri hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerilajien välillä. Yleensä nämä konservoituneet alueet ovat proteiinin toiminnan kannalta kaikkein tärkeimpiä alueita. GyrB/ParE-molekyylit eivät kuitenkaan ole yhtä konservoituneita kuin

tenkaan ole yhtä konservoituneita kuin ribosomaaliset RNA-molekyylit. Koska kyseessä ovat proteiinimolekyylit, niitä koodaavissa geeneissä on geneettisen koodin luonteesta johtuen enemmän eroja nukleiinihappotasolla kuin mitä rakenteellisia RNA-molekyylejä (esim. 16S rRNA -molekyylit) koodaavissa geeneissä. GyrB/ParE-molekyylit eivät myöskään kokonaisuudessaan ole evoluution kuluessa säilyneet yhtä muuttumattomina kuin rakenteelliset RNA-molekyylit: *gyrB/parE*-molekyyleistä on löydettävissä myös lyhyitä jaksoja, joissa erot eri bakteerilajien välillä ovat niin suuria (myös lähisukuisten välillä), että kyseisiä jaksoja voidaan pitää lajispesifisinä.

Edellä mainittuja ominaisuuksia käytettiin hyväksi bakteerilajeille spesifisten koettimien suunnittelemisessa. Lajispesifisten koettimien (eli oligonukleotididen) (taulukot 4A ja 4B) suunnittelussa käytettiin linjaukseen perustuvaa suunnittelustrategiaa. Suunnittelun kohteena olleiden bakteerien *gyrB*-tai *parE*-geenit linjattiin referenssibakteereista lähtöisin olevien vastaavien geenien kanssa. Sekvenssit saatiin EMBL:n sekvenssitietokannasta tai tuotettiin itse kloonamalla niistä bakteerilajeista, joista *gyrB/parE*-sekvenssiä ei ollut saatavilla julkisista sekvenssitietokannoista. Sekvenssit tuotettiin monistamalla bakteeripuhdasviljelmistä haluttu *gyrB/parE*-sekvenssijakso, joka sitten kloonattiin ja sekvensoitiin. Esimerkki kahden bakteerin, *Haemophilus influenzae* ja *Moraxella catharralis*, hypervarioivasta *gyrB*-geenialueesta, joka rajoittuu konservatiivisiin alueisiin, on esitetty kuviossa 1. Konservoituneet alueet on merkitty harmailla laatikoilla ja ne toimivat universaalien *gyrB/parE*-alukkeiden kiinnitysmiskohtina. Näiden väliin jää hypervarioiva alue, jolle lajispesifiset koettimet on suunniteltu (alleviivatut kohdat).

Sekvenssien linjauksessa käytettiin BioEdit-ohjelmaa ja ClustalW-linjausalgoritmia. Linjauksesta laskettiin konsensussekvenssi ja sopivasti konservoituneet alueet etsittiin manuaalisesti. Nämä alueet tarkoittavat sekvenssijaksoja, jotka ovat konservoituneet suunnittelun kohteena olevien bakteerien geeneissä, mutta joita ei löydy ainakaan kokonaan referenssibakteerien geeneistä. Näistä jaksoista valittiin sopivan pituiset (esim. 21 - 25 emästä) sekvenssijaksot varsinaisten oligonukleotidien sekvensseiksi. Valittuja oligonukleotidisekvenssejä verrattiin EMBL:n prokaryoottitietokantaan FASTA-algoritmia käyttävällä ohjelmalla. Ne oligonukleotidisekvenssit, jotka erosivat muiden kuin suunnittelun kohteena olevien bakteerien *gyrB/parE*-geeneistä vähintään kahden emäksen verran, valittiin jatkotutkimuksiin. Oligonukleotideille määritettiin teoreettinen sulamislämpötila (T_m) ja tutkittiin, muodostavatko

oligonukleotidit hiusneularakenteita. Ne oligonukleotidit, jotka eivät muodostaneet voimakkaita sekundaarirakenteita ja joiden T_m-lämpötila oli vähintään 45 °C, valittiin kokeellisiin spesifisyystutkimuksiin. Laboratoriossa koettimien spesifisyys testattiin ensin useilla eri bakteerilajeista eristetyillä DNA-näytteillä (esimerkki 3, taulukko 3) sekä lisäksi potilasnäytteillä (esimerkki 6, taulukko 5).

Esillä olevan keksinnön mukaiset oligonukleotidikoettimet käsittävät sekvenssien tunnusnumerot 1 – 69 mukaiset sekvenssit tai niiden kanssa käänteiset ja komplementaariset sekvenssit tai näiden käänteiset sekvenssit. Ne voivat olla eripituisia, ja niiden sopivan pituuden määrää vain haluttu lajispesifisyys ja toimivuus hybridisaatioreaktiossa. Tavallisesti ne ovat 15 – 30, edullisesti 20 – 30 ja edullisimmin 21 – 25, nukleotidiä pitkiä. Koettimet voivat myös olla eri tavoin modifioituja (ne voivat esimerkiksi sisältää modifioituja nukleotidejä, kuten inosiini), niihin voi olla liitettynä erilaisia kemiallisia yhdisteitä tai ryhmiä (esim. aminoryhmiä) tai muita molekyyliä, kuten erilaisia detektioon tarvittavia leimoja tai niistä voi kokonaan puuttua modifikaatiot. Edullisten keksinnön mukaisten bakteerilajispesifisten koettimien sekvenssit ja spesifisyys on esitetty taulukoissa 4A ja 4B ja niillä on sekvenssien tunnusnumerot 1 – 69 mukaiset sekvenssit. Luonnollisesti näiden oligonukleotidisekvenssien käänteiset ja komplementaariset sekvenssit ovat yhtä käyttökelpoisia ja edullisia, kuten alan ammattimiehelle on ilmeistä. Samoin mainittujen oligonukleotidisekvenssien toiminnalliset fragmentit ovat käyttökelpoisia koettimina edellyttäen, että lajispesifisyys säilyy.

PCR-alukkeiden suunnittelua varten eri fylogeneettisistä ryhmistä valittujen bakteerien, jotka on esitetty taulukossa 2, gyrB-proteiinien (GyrB) aminohapposekvenssit linjattiin BioEdit -ohjelmalla käyttäen ClustalW-linjausalgoritmia. Linjauksesta löytyi useita konservoituneita alueita, jotka otettiin universaalien alukkeiden suunnittelun lähtökohdaksi. ParE-proteiini on GyrB-proteiinin sukulainen ja tietyillä bakteereilla (gram-positiiviset bakteerit) edellä mainitut konservoituneet kohdat löytyvät molemmista geeneistä. Konservoituneet aminohappojaksot käännettiin takaisin nukleiinihapposekvenssiksi. Geneettisen koodin luonteesta johtuen alukkeisiin tuli useita degeneroituneita kohtia. Konservoituneiden jaksojen perusteella valmistettiin useita alukepareja, joita testattiin laboratoriossa (spesifisyys- ja herkkyystestaukset). Laboratoriotestien perusteella todettiin, että puhtaan bakteeri-DNA:n monistuminen onnistuu hyvin osalla alukepareista, ja alukkeilla voidaan monis-

taa kaikkien bakteerien *gyrB/parE*-geenejä. Kyseiset alukkeet toimivat siis universaaleina alukkeina bakteereille.

Yksi alukepareista osoittautui herkkyydeltään muita paremmaksi ja tällä alukeparilla jatkettiin testejä kliinisistä näytteistä. Osoittautui kuitenkin, että alukepari ei pysty monistamaan bakteeri-DNA:ta kliinisistä näytteistä, joissa on mukana ylimäärin ihmisen DNA:ta. Tästä syystä alukeparia muutettiin ja degeneroitumisen suhteen etsittiin uusia alukevaihtoehtoja, jotka toisaalta toimisivat myös kliinistä näytteistä, mutta jotka samalla säilyttäisivät riittävän laajan spesifisyyden eli niiden avulla voitaisiin monistaa kaikkien hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerien *gyrB/parE*-geenit. Toimiva alukepari on esitetty taulukossa 1. Tämän alukeparin avulla kaikkien fylogeneettisesti hyvinkin etäällä toisistaan olevien bakteerien *gyrB/parE*-geenit (taulukko 3) voidaan monistaa myös tilanteessa, jossa näytteessä on runsaasti ihmisen DNA:ta.

Taulukko 1. *gyrB/parE*-universaalialukkeet

Alukkeen nimi	Sekvenssi 5'→3'
gB1F	CGTCCWGGKATGTAYATHGG
gB2R	CCHACRCCRTGWAAWCCDCC

Alukesekvensseissä

W tarkoittaa emästä A tai T,

K tarkoittaa emästä G tai T,

Y tarkoittaa emästä C tai T,

H tarkoittaa emästä A tai C tai T,

R tarkoittaa emästä A tai G ja

D tarkoittaa emästä A tai G tai T.

Kyseessä ovat siis alukeseokset, jotka koostuvat useista eri alukevaihtoehtoista. Esim. alukkeen gB1F tapauksessa seoksessa on siis alukkeita, joissa W:n kohdalla on A (adeniini) ja alukkeita jossa W:n kohdalla on T (tymiini).

Keksinnön mukaisesti spesifisiä koettimia voidaan käyttää infektiota, erityisesti hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerien tunnistamiseksi missä tahansa sopivassa menetelmässä, jolla hybridisaatio voidaan osoittaa. Tällaiset menetelmät ovat alan ammattilaisten hyvin tuntemia ja ne voidaan toteut-

taa sekä liuoksessa että DNA:ta sitovalla kiinteällä kantajalla, kuten nitroselluloosa- tai nylonkalvolla, tai lasilla.

Edullisessa keksinnön mukaisessa menetelmässä toteaminen tehdään käyttäen DNA-sirutekniikkaa, jolloin DNA-sirulla tai DNA-lastulla (chip) 5 tarkoitetaan pienikokoista alustaa, jolle tunnettuja nukleiinihappojaksoja on kiinnitetty tiettyyn ennalta määrättyyn järjestykseen. Jos sirulle kiinnitetyt nukleiinihappojaksot ovat lyhyempiä kuin 100 emäsparia (yleensä noin 20 - 30 emäsparia), puhutaan ns. oligonukleotidisiruista.

Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä analysoitava 10 näyte voi olla bakteeriviljelmä, kudospala, eritenäyte, kuten yskös- tai sivelynäyte, verinäyte tai muu sopiva näyte, erityisesti eritenäyte kliinisissä diagnostisissa sovelluksissa.

Analysoitavasta näytteestä eristetään DNA millä tahansa tunnetulla menetelmällä, kuten kaupallisesti saatavilla olevilla DNA:n eristyskitteillä (esim. 15 High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche; NucleoSpin, BD Biosciences Clontech tai QIAamp DNA Mini-kit, Qiagen) tai perinteisillä fenoli-kloroformi tai vastaavilla orgaanisilla liuottimilla tehtävillä uutoilla, joko manuaalisesti tai erityisillä DNA:n eristykseen soveltuvilla laitteilla. Edullisesti käytetään helpon saatavuuden, nopeuden ja toistettavuuden vuoksi kaupallisia kittejä.

Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä DNA:n monistukseen käytettävät reagenssit voivat olla mitä tahansa alalla DNA:n monistukseen käytettyjä reagensseja, jotka alan ammattimiehet hyvin tuntevat. Sopivia ja edullisia kaupallisesti saatavissa olevia reagensseja ovat erityyppiset Taq-DNA-polymeraasit ja niiden puskurit (esim. AmpliTaqGOLD, AmpliTaqLD, Dy- 25 NAzyme, TaqPlus Precision ja HotStartTaq), nukleotidit tai valmiit nukleotidiseokset (esim. Sigma, Applied Biosystems, Amersham Biosystems), $MgCl_2$ (jolloin yleensä käytetään saman valmistajan tuotetta kuin Taq-DNApolymeraasi), Cy5-dCTP (esim. NEN LifeSciences, Amersham Biosciences).

Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä kloonaukseen voidaan suorittaa millä tahansa tunnetulla menetelmällä, kuten kaupallisesti saatavilla olevilla kloonaukskitillä (esim. Qiagen PCR Cloning Kit, QIAGEN tai TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). Kloonaustuotteen sekvensointi voidaan suorittaa millä tahansa tähän tarkoitukseen soveltuvalla sekvensaattorilla (esim. 35 Applied Biosystems, mallit 373A, 377 tai 3100 tai Bio-Rad Sequi-Gen GT) tai manuaalisella sekvenssoinnilla. Sekvenssitulokset voidaan analysoida manuaa-

lisesti tai tähän tarkoitukseen kehitetyillä sekvenssianalyysiohjelmilla (Applied Biosystems Sequencer tai InforMax:in Vector NTI Suite Version 7).

Monistukseen käytettävä laitteisto voi niin ikään olla mikä tahansa sopiva laitteisto (esim. T1 Thermocycler, Biometra tai GenAmp PCR system 2700, Applied Biosystems). Käytännössä kaikki DNA-monistukseen sopivat laitteet ja laitteistot sopivat tarkoitukseen ja monistus voidaan myös suorittaa manuaalisesti siirtämällä reaktioputkia lämpötilasta toiseen. Monistus voidaan myös tehdä suoraan DNA-sirulla.

Monistustuotteen puhdistus voidaan suorittaa millä tahansa kaupallisella menetelmällä (esim. High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, MicroSpin S-400 tai S-300 HR Columns, Amersham Biosciences tai QIAquick PCR-purification-Kit, Qiagen) tai se voidaan tehdä orgaanisella liuottimella tapahtuvalla uutolla. Monistustuotetta voidaan käyttää hybridisaatioreaktioon myös sellaisenaan ilman puhdistusta tai uuttoa.

Yksijuosteisen kohdejuosteiden aikaansaamiseksi voidaan käyttää mitä tahansa tunnettua menetelmää. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi epäsymmetrinen PCR, eksonukleasimenetelmää tai yksijuosteisen kohdejuosteiden syntetisointi suoraan sirulla (esim. matriXarray, Roche Applied Science). Keksintö käsittää myös sovellukset, joissa hybridisaatioreaktioon voidaan käyttää kaksijuosteista monistustuotetta. Tässä edullinen menetelmä yksijuosteisen kohdejuosteiden aikaansaamiseksi on epäsymmetrinen PCR.

Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan leimattujen kohdejuosteiden aikaansaamiseksi käyttää mitä tahansa sopivaa leimaa. Sopivia leimoja ovat fluorerenssileimat (esim. Cy5, Cy3, Cy2, TexasRed, FITC, Alexa 488, TMR, FluorX, ROX, TET, HEX), radioaktiiviset leimat (esim. ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S) ja kemiluminesoivat leimat (esim. HiLight Single-Color Kit). Tässä keksinnössä Cy5-dCTP fluoresenssileima (Amersham Biosciences) on edullinen. Keksintö käsittää myös sovellukset, joissa leimaa ei tarvita lainkaan, kuten sellaiset, joissa toteaminen perustuu sähköiseen impulssiin (esim. Motorola eSensor).

Kun hybridisaatio tapahtuu kiinteällä kantajalla, hybridisaatiossa käytettävät koettimet voidaan kiinnittää alustaansa kovalenttisen tai ei-kovalenttisen sidoksen avulla tai kiinnittämisessä voidaan käyttää muuta olemassa olevaa kemiallista, sähkökemiallista tai vastaavaa menetelmää. Alusta, jolle koettimet kiinnitetään voi olla valmistettu lasista, muovista, metallista, nailonista, nitroselluloosasta, polyakryyliamidista, silikonista tai näiden yhdistel-

mistä, ja sen koko voi vaihdella muutamasta millimetristä kymmeniin senttimetreihin. Käytettävän alustan pintakäsittely voi olla aminosilaani- tai mikä tahansa muu soveltuva pintakäsittely, kuten esimerkiksi epoksisilaanipintakäsittely, tai voidaan käyttää sellaista alustaa, joka ei vaadi erillistä pintakäsittelyä. Tässä edullinen alusta koettimille on aminosilaanilla käsitelty mikroskooppilasi (Geno-

rama, Asper Biotech Ltd., Eesti).

Koettimet voidaan printata käytettävälle alustalle millä tahansa kaupallisesti saatavilla olevalla ja tähän tarkoitukseen soveltuvalla laitteistolla (esim. Qarray-mini arraying system, Lucidea Array Spotter tai OmniGrid, GeneMachines arrayer) tai ne voidaan pipetoida alustalle manuaalisesti. Koettimet voidaan myöskin syntetisoida suoraan alustalle esimerkiksi fotolitografiaa käyttämällä.

Hybridisaatiossa käytetty hybridisaatioseos voi olla koostumukseltaan erilainen kuin mitä jäljempänä suoritusesimerkeissä on esitetty, mm. suolan koostumus ja/tai suolapitoisuus voivat vaihdella (esim. 2-4xSSC tai SSPE) tai hybridisaatiossa voidaan käyttää kaupallisesti saatavilla olevia hybridisaatioliuoksia (esim. ArrayHyb, Sigma). Hybridisaatioseoksessa voidaan myöskin käyttää denaturoivia tai stabiloivia lisäaineita (esim. formamidi tai DMSO, dimetyylisulfoksidi) tai aineita, jotka vähentävät epäspesifistä sitoutumista (esim. BSA eli naudan seerumin albumiini tai ssDNA eli lohen maidin DNA). Hybridisaatio voidaan tehdä eri hybridisaatiolämpötilassa (yleensä välillä 40 - 70 °C) ja hybridisaatioon käytettävä aika voi vaihdella riippuen sovelluksesta muutamasta minuutista vuorokauteen. Hybridisaatio voidaan vesihauteen sijaan tehdä esim. lämpökaapissa tai erityisessä hybridisaatiolaitteessa (esim. GeneTAC HybStation tai Lucidea Slidepro Hybridizer). Hybridisaation jälkeiset pesut voivat myöskin kestoltaan, määrältään, lämpötilaltaan ja käytettävän pesuliuoksen koostumukseltaan olla erilaiset kuin mitä tässä on esitetty. Lasien pesu voidaan myös suorittaa erillisellä laitteella. Joissakin tapauksissa hybridisaation jälkeinen lasin tai sirun pesu ei ole välttämätön, vaan siru voidaan analysoida heti hybridisaation jälkeen. Tässä edullinen hybridisaatio-olosuhde on +57 °C vesihaude, jossa laseja hybridisoitiin 12 - 16h.

Koetinlasit tai -sirut voidaan analysoida millä tahansa tähän tarkoitukseen soveltuvalla laitteistolla tai lukijalla (esim. GeneTAC UC4, GenePix Personal 4100A tai Agilent DNA Microarray Scanner) Jos kohdejuoste on leimattu fluoresoivalla leimalla, voidaan analysointiin käyttää myös esim. fluoresenssimikroskooppia. Jos leimana on käytetty radioaktiivista leimaa, voidaan

siru tai kalvo analysoida autoradiografialla. Jos hybridisaatio on tehty elektronisella sirulle ja toteaminen perustuu esim. sähköiseen impulssiin, analysoidaan ne tätä tarkoitusta varten suunnitellulla laitteistolla.

Vasta muutamien kymmenien bakteerilajien perimä on kokonaisuudessaan kartoitettu ja suurin osa näistä kartoitetuista lajeista on tunnettuja taudinaiheuttajia. On siis vielä hyvin vähän tietoa ns. normaaliflooran bakteereista ja niiden DNA-sekvensseistä. Tämän vuoksi bakteerilajispesifisten PCR-alukkeiden suunnittelu ja pelkkään PCR-monistukseen perustuva diagnostiikka onkin lähes mahdotonta.

Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä ei kärsi tunnetun tekniikan ongelmista. Menetelmän monistusvaihe on hyvin herkkä ja universaalit alukkeet monistivat tehokkaasti tietyn geenialueen (*gyrB/parE*) fylogenetisesti erilaisista bakteerilajeista riippumatta siitä, oliko kyseessä gramnegatiivisen vai grampositiivisen soluseinän omaava bakteerilaji (taulukko 3). Lisäksi monistustuote on lyhyt (noin 300 emäsparia), mikä edesauttaa monistusreaktion tehokkuutta.

Bakteerilajispesifiset koettimet on suunniteltu *gyrB/parE* geenialueelle, joka on huomattavasti varioivampi geenialue kuin esim. 16S rRNA -alue, jota on aiemmin käytetty bakteeridiagnostiikassa. Vaikka menetelmässä käytetyt universaalit alukkeet monistavatkin tehokkaasti myös normaaliflooran bakteereita, tämä ei aiheuta vääriä positiivisia, sillä keksinnön mukaiset koettimet ovat hyvin lajispesifisiä ja tunnistavat vain ne bakteerit, joita varten ne on suunniteltu. Hybridisoitaessa lasille esim. *Streptococcus pneumoniae* -puhdasviljelmästä monistettua kohdejuostetta, hybridisoituu se ainoastaan *Streptococcus pneumoniae* -spesifisten koettimien ja positiivisen kontrollikoettimen kanssa. Toisaalta hybridisoitaessa lasille vain normaaliflooran bakteerista, esim. *Streptococcus mitis*, monistettua kohdejuostetta, se ei sitoudu yhteenkään patogeenikoettimeen, vaan ainoastaan positiiviseen kontrollikoettimeen (esimerkki 7, taulukko 6). Kaikki esillä olevan keksinnön mukaiset spesifiset oliginukleotidikoettimet testattiin 30 erisiin eri bakteerilajien ja myös useiden normaaliflooraan kuuluvien lajien kanssa, eikä ristireaktioita tapahdu (kuvio 2, taulukko 6). Siten esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä on selvästi herkempi ja spesifisempi kuin aiemmin kuvatut vastaavantyyppiset menetelmät.

Seuraavaksi keksintöä valaistaan tarkemmin esimerkkien avulla. Menetelmää kuvattaessa on viitattu erilaisiin, tässä sovelluksessa käytettyihin

laitteistoihin, materiaaleihin, lämpötiloihin, kemikaaleihin tai vastaaviin. Nämä voivat luonnollisesti vaihdella keksinnön eri sovelluksissa tarkoituksenmukaisella tavalla, eivätkä keksintö ja sen suoritusmuodot siten rajoitu alla kuvattuihin esimerkkeihin.

5 Esimerkki 1. Keksinnön mukaisten PCR-alukkeiden suunnittelu

PCR-alukkeiden suunnittelua varten eri fylogeneettisistä ryhmistä valittujen bakteerien (taulukko 2) gyrB-proteiinien (GyrB) ja sen sukulaisproteiinin ParE aminohapposekvenssit linjattiin BioEdit-ohjelmalla käyttäen ClustalW-linjausalgoritmia. GyrB:n linjauksesta löytyi useita konservoituneita alueita. Tutkituille grampositiivisille bakteereille samat konservoituneet kohdat löytyivät myös parE-geenistä.

Nämä konservoituneet aminohappojaksot otettiin universaalien alukkeiden suunnittelun lähtökohdaksi. Ensin ne käännettiin takaisin nukleiinihapposekvenssiksi, jolloin niihin tuli geneettisen koodin luonteesta johtuen useita degeneroituneita kohtia. Sitten konservoitujen jaksojen perusteella syntetisoitiin (alukkeet syntetisoi Sigma-Genosys, Englanti, josta alukkeet tilattiin tilauspalvelun kautta www.sigma-genosys.co.uk) useita alukepareja, jotka testattiin spesifisyyden ja herkkyys suhteen. Spesifisyys testattiin monistamalla taulukossa 4 esitetyistä eri bakteerilajeista eristettyä DNA jäljempänä olevassa esimerkissä 4 kuvatulla tavalla. Alukeparin herkkyys määritettiin analysoimalla, kuinka pieni pitoisuus *H. influenzae* DNA:ta eri alukepareilla voitiin todeta käyttäen jäljempänä esimerkissä 4 kuvattua monistus- ja toteamismenetelmää.

Näiden testien perusteella todettiin, että puhtaan bakteeri-DNA:n monistuminen onnistui hyvin osalla alukepareista, ja alukkeilla voitiin monistaa kaikkien tutkittujen bakteerien gyrB/parE-geenejä. Kyseiset alukkeet toimivat siis universaaleina alukkeina bakteereille. Alukkeiden herkkyudet vaihtelivat ja herkkyydeltään parhaita alukeparia käytettiin kliinisten näytteiden (välikorvatulehdusnäytteiden) tutkimiseen. Osoittautui kuitenkin, ettei alukepari ollut riittävän sensitiivinen, sillä se ei pystynyt monistamaan bakteeri-DNA:ta kliinisistä näytteistä, joissa on mukana ylimäärin ihmisen DNA:ta.

Tästä syystä syntetisoitiin uusia, degeneroitumisen suhteen erilaisia alukepareja (alukkeet syntetisoi Sigma-Genosys, Englanti, josta alukkeet tilattiin tilauspalvelun kautta www.sigma-genosys.co.uk), joiden spesifisyys ja herkkyys tutkittiin edellä kuvatulla tavalla sekä puhtaalla bakteeri-DNA:lla, että kliinisistä näytteistä eristetyllä DNA:lla. (taulukossa 5 mainitut näytteet). Toimiva alukepari oli alukeseos, joka sisälsi sekvenssit

CGTCCWGGKATGTAYATHGG (sekvenssi tunnusnumero 77) ja
CCHACRCCRTGWAAWCCDCC (sekvenssi tunnusnumero 78),
jotka nimettiin gB1:ksi ja vastaavasti gB2R:ksi (taulukko 1), jolloin
W tarkoittaa emästä A tai T,
5 K tarkoittaa emästä G tai T,
Y tarkoittaa emästä C tai T,
H tarkoittaa emästä A tai C tai T,
R tarkoittaa emästä A tai G ja
D tarkoittaa emästä A tai G tai T.

10 Tämä alukeseos tunnisti kaikilla tutkituilla bakteereilla konservoi-
tuneet alueet *gyrB*- ja/tai *parE* -geenin alkuosasta. Se toimii kliinisillä näytteillä
ja on säilyttänyt riittävän laajan spesifisyyden, jolloin sen avulla voidaan monis-
taa kaikkien hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerien *gyrB*/*parE*-geenit
(katso esimerkit 6 ja 7). Erityisesti tämän alukeparin avulla fylogeneettisesti
15 hyvinkin etäällä toisistaan olevien bakteerien (taulukko 3) *gyrB*/*parE*-geenit
voidaan monistaa myös tilanteessa, jossa näytteessä on runsaasti ihmisen
DNA:ta.

Taulukko 2. Bakteerit, joiden *gyrB*-proteiinien (GyrB) aminohapposekvenssejä käytettiin linjaukseen.

5	Suku	Laji
	<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>
	<i>Mycobacterium</i>	<i>tuberculosis</i>
10	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>
	<i>Thermotoga</i>	<i>maritima</i>
	<i>Chlamydia</i>	<i>pneumoniae</i>
	<i>Chlamydia</i>	<i>trachomatis</i>
	<i>Borrelia</i>	<i>burgdorferi</i>
15	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
	<i>Neisseria</i>	<i>gonorrhoeae</i>
	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>
	<i>Myxococcus</i>	<i>xanthus</i>
	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
20	<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>
	<i>Bartonella</i>	<i>bacilliformis</i>
	<i>Aquifex</i>	<i>aeolicus</i>

25 Taulukko 3. Alukkeiden ja koettimien spesifisyyden ja sensitiivisyyden testaamisessa käytetyt bakteerikannat

Bakteerilaji	Toimittajan koodi (näytteen tyyppi)
<i>Hemophilus influenzae</i>	ATCC 51907D (DNA)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 53420D (DNA)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 15531D (DNA)
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33152D (DNA)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 47085D (DNA)

<i>Moraxella catarrhalis</i>	DSM 9143 (bakt.kanta)
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20231 (bakt.kanta)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSM 20565 (bakt.kanta)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSM 20566 (bakt.kanta)
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	DSM 20698 (bakt.kanta)
<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083 (bakt.kanta)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50071 (bakt.kanta)
<i>Streptococcus oralis</i>	DSM 20627 (bakt.kanta)
<i>Streptococcus mitis</i>	DSM 12643 (bakt.kanta)
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	DSM 8978 (bakt.kanta)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	DSM 8925 (bakt.kanta)
<i>Moraxella caviae</i>	ATCC 14659 (bakt.kanta)
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	ATCC 13669 (bakt.kanta)
<i>Moraxella cuniculi</i>	ATCC 14688 (bakt.kanta)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	ATCC VR 1355 (bakt.kanta)

ATCC = American Type Culture Collection

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Esimerkki 2. Keksinnön mukaisten oligonukleotidikoettimien suunnittelussa tarvittavien uusien sekvenssien tuottaminen kloonaamalla

Bakteerien *Moraxella catarrhalis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* ja *Haemophilus parainfluenzae* gyrB-sekvenssit, jotka eivät ole saatavilla julkisista sekvenssitietokannoista, syntetisoitiin seuraavassa esitetyn yleisen menetelmän mukaisesti käytettäväksi keksinnön mukaisten oligonukleotidikoettimien suunnittelussa.

Bakteeripuhdasviljelmistä eristetään ensin DNA käyttäen QIAamp DNA Mini -kittiä (Qiagen, Saksa). Kun DNA on eristetty, halutulta DNA-alueelta monistetaan kloonaukseen käytettävä kohdejuoste symmetristä (tavallista) polymeerasi-ketjureaktiota (PCR) käyttäen. Monistuksen ensimmäisessä vaiheessa valmistetaan reaktioseos sekoittamalla näytteestä eristetty DNA esimerkissä 1 valmistettujen universaalien bakteerialukkeiden ja muiden monistukseen tarvittavien komponenttien kanssa. Tällöin kloonaus-PCR:ssä 25 µl:n reaktioseos sisältää 20 pmol gB2r-alukeseosta, 20 pmol gB1F-alukeseosta, 200 µM kutakin dATP, dGTP, dTTP ja dCTP (Sigma, USA), 1 x Hot Start Taq

PCR -puskuria (Qiagen, Saksa), johon lisätty MgCl_2 :a siten, että lopullinen konsentraatio on 2,8 mM, 7,5 % DMSO:ta (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 2,5 U Hot Start Taq DNA-polymeraasia (Qiagen, Saksa) ja 2,5 μl eristettyä DNA:ta.

- 5 Kloonaus-PCR-reaktio tehdään GenAmp PCR system 2700 -PCR-laitteessa (Applied Biosystems) käyttäen seuraavanlaista lämpöohjelmaa: 15 min alkudenaturaatio lämpötilassa 95 °C, 40 sykliä 1 min lämpötilassa 95 °C, 1 min lämpötilassa 50 °C, 1 min lämpötilassa 72 °C sekä 10 min loppupidennys lämpötilassa 72 °C. Kun PCR-reaktio on valmis, monistumisen onnistuminen
10 tarkastetaan geelielektroforeesilla 2-%:isessä agarosigeelissä, joka sisältää etidiumbromidia.

- Itse kloonaus tehdään välittömästi PCR-reaktion jälkeen TOPO TA Cloning Kit -pakkauksella (Invitrogen). Kloonausreaktioseos sisältää 4 μl PCR-tuotetta, 1 μl suolaseosta (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl_2) ja 1 μl TOPO-vektoria
15 (pCR 4-TOPO), jotka sekoitetaan keskenään eppendorfputkessa. Seosta inkuboidaan 5 min huoneenlämmössä, minkä jälkeen seosputki siirretään jäille. Tämän jälkeen tehdään kemiallinen transformaatio, jossa jäähtynyttä PCR-tuote-vektori-seosta lisätään 2 μl kompetenteille TOP10 *E. coli* -soluille (50 μl soluja). Tämän jälkeen soluja inkuboidaan jäillä 10 min. Seuraavaksi tehdään
20 lämpösokkikäsittely, jossa soluputki siirretään +42 °C:een 30 sekunnin ajaksi. Sitten putki siirretään jäille ja siihen lisätään 250 μl huoneenlämpöistä SOC-liuosta (2 % tryptoni, 0,5 % hiivauute, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM glukoosi). Tämän jälkeen putkea ravistellaan vaakasuunnassa (200 rpm) +37 °C:ssa 1 tunti. Seuraavaksi 20 μl seosta maljataan
25 LB-bakteerimaljalle (Luria-Bertani, 10 % tryptonia, 0,5 % hiivauutetta, 1,0 % NaCl, 1,5 % L-agar:ia laimennettuna veteen, pH 7), joka sisältää 50 g/ml ampisilliiniä. Maljoja kasvatetaan +37 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä maljalta valitaan kymmenen pesäkettä, joista tehdään sekvensointi-PCR.

- Sekvensointi-PCR:ssä 50 μl :n reaktioseos sisältää 0,4 pmol M13-
30 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') ja M13-forward (5'-GTAAACGACGGCCAG) -alukkeita (sisältyvät kittiin), 150 μM kutakin dATP, dGTP, dTTP ja dCTP (Sigma, Yhdysvallat), 1 x Hot Start Taq PCR -puskuria (Qiagen, Saksa), 1 U Hot Start Taq DNA-polymeraasia (Qiagen, Saksa). Monistusta varten pieni osa bakteeripesäkkeestä siirretään näytetikulla PCR-
35 seosputkeen.

Sekvensointi-PCR-reaktio tehdään GenAmp PCR system 2700 -PCR-laitteessa (Applied Biosystems) käyttäen seuraavanlaista lämpöohjelmaa: 15 min alkudenaturaatio lämpötilassa 95 °C, 30 sykliä 1 min lämpötilassa 94 °C, 1 min lämpötilassa 55 °C, 1 min lämpötilassa 72 °C sekä 10 min loppu-
 5 pidennys lämpötilassa 72 °C. Kun PCR-reaktio on valmis, monistumisen onnistuminen tarkastetaan geelielektroforeesilla 2-%:isessa agarosigeelissä, joka sisältää etidiumbromidia. Tämän jälkeen PCR-tuote puhdistetaan poistamalla reaktioseoksesta ylimääräiset alukkeet, nukleotidit, puskuri ja polymeraasientsyymi QIAquick PCR -puhdistuskitillä (Qiagen, Saksa).

10 Puhdistuksen jälkeen vektoriin insertoitunut fragmentti sekvensoidaan. Kaksitoista mikrolitraa sekvensointireaktioseosta sisältää 100 ng PCR-tuotetta ja 5 pmol joko M13-reverse tai M13-forward-aluketta. Sekvensointi tehdään BigDye Terminator Version 3.0 -kitillä ja ABIPRISM 3100 -laitteistolla (Applied Biosystems, Yhdysvallat). Sekvenssit analysoidaan Vector NTI Suite
 15 Version 7-ohjelmistolla (InforMax).

Edellä kuvatulla yleisellä menetelmällä tuotettiin *gyrB*-sekvenssit seuraaville bakteerilajeille: *Moraxella catarrhalis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus. mitis*, *Streptococcus oralis* ja *Haemophilus. parainfluenzae* (sekvenssit tunnusnumero 70 - 75).

20 **Esimerkki 3. Lajispesifisten koettimien suunnittelu**

Lajispesifisten oligonukleotidien eli koettimien suunnittelussa käytettiin linjaukseen perustuvaa suunnittelustrategiaa. Suunnittelun kohteena olleiden bakteerien *gyrB*- tai *parE*-geenit linjattiin muutamasta referenssibakteerista (läheistä sukua olevasta bakteerista) lähtöisin olevien vastaavien geenien
 25 kanssa. Esimerkiksi *Streptococcus pneumoniae* *gyrB*-geeni linjattiin bakteereista *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Mycoplasma hominis*, *Staphylococcus aureus* ja *Fusobacterium necrophorum* *gyrB*-geenien kanssa. *S. oralis* ja *S. mitis* ovat *S. pneumoniae* läheistä sukua olevia bakteereja, eivätkä oligonukleotidit saa reagoida näiden normaaliflooraan kuuluvien bakteerien kanssa. Sekvenssit saatiin EMBL:n sekvenssitietokannasta tai ne tuotettiin kloonamalla esimerkissä 2 kuvatulla tavalla.

Sekvenssien linjauksessa käytettiin Bio Edit -ohjelmaa ja ClustalW-linjausalgoritmia. Linjauksesta laskettiin konsensussekvenssi ja sopivasti konservoituneet alueet etsittiin manuaalisesti. Nämä alueet tarkoittavat sekvenssijaksoja, jotka ovat konservoituneet suunnittelun kohteena olevien bakteerien
 35 geeneissä, mutta joita ei löydy ainakaan kokonaan referenssibakteerien gee-

neistä. Näistä jaksoista valittiin sopivanpituiset sekvenssijaksot varsinaisten oligonukleotidien sekvensseiksi (21 - 25 emästä). Valittuja oligonukleotidisekvenssejä verrattiin EMBL:n prokaryoottitietokantaan FASTA-algoritmiä käyttävällä ohjelmalla. Ne oligonukleotidisekvenssit, jotka erosivat muiden kuin
 5 suunnittelun kohteena olevien bakteerien *gyrB/parE* -geeneistä vähintään kahden emäksen verran, valittiin jatkotutkimuksiin. Oligonukleotideille määritettiin teoreettinen sulamislämpötila (T_m) ja tutkittiin, muodostavatko oligonukleotidit sekundaarirakenteita. T_m ($^{\circ}\text{C}$) laskettiin kaavalla

$$81,5 + 16,6 \log [\text{Na}] + 0,41(\% \text{GC}) - 0,61 (\% \text{for}) 500/N,$$

10 jolloin Na on monovalenttien kationien pitoisuus (laskuissa 50 M), %GC on guaniini- ja sytosiini-emästen osuus prosentteina, %for on formaliinipitoisuus (laskuissa 0 %) ja N on oligonukleotidin pituus. Sekundaarirakenteiden muodostumista tutkittiin Sigma-Genosysin tarjoamaa ohjelmaa käyttäen. Ohjelma voi käyttää www-selaimen avulla osoitteesta [http://www.sigma-](http://www.sigma-genosys.co.uk/oligos/frameset.html)
 15 [genosys.co.uk/oligos/frameset.html](http://www.sigma-genosys.co.uk/oligos/frameset.html) (calculators/basic calculator). Ne oligonukleotidit, jotka eivät muodostaneet voimakkaita sekundaarirakenteita ja joiden T_m -lämpötila oli vähintään 45°C valittiin kokeellisiin spesifisyystutkimuksiin.

Oligonukleotidikoettimet syntetisoitiin ja samalla modifioitiin 5'-päästään (NH_2 -modifioidut oligot) (Sigma-Genosys, Englanti). Laboratoriossa
 20 koettimien spesifisyys testattiin useilla eri bakteerilajeista eristetyillä DNA-näytteillä (taulukko 3) sekä potilasnäytteillä (taulukko 5) esimerkeissä 4 ja 5 kuvatuilla tavoilla. Testatuista koettimista valittiin ne, jotka toimivat parhaiten ja osoittautuivat kaikkein spesifisimmiksi. Bakteerilajispesifisten koettimien sekvenssit ja spesifisyys on esitetty taulukoissa 4A ja 4B.

Taulukko 4A. gyrB-oligonukleotidisekvenssit

Oligonukleotidi/ sekvenssinumero	Spesifisyys (gyrB-geeni)	Sekvenssi (5'-3')
1/1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CTCAAAAGAAGGTCTTCACCATC
2/2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GCCATATTCAAGTTTTATTGAG
3/3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	AGCCAGATGATTGATTACTGTT
4/4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	TTGAGACCGTCTTTACAGTCCTT
5/5	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GTTTTGCCTCTCATATTAAGTC
6/6	<i>Streptococcus pyogenes</i>	TCTTTATTGAAGCAGATAATTCC
7/7	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CGTTGAAACAGTTTTTACAGTCT
8/8	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGTCTTCATCATCTAGTCTATGA
9/9	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGTTGTAGACWACAGCATTGACG
10/10	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	AGCCATGGCAGSTTATTGCTCTA
11/11	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGATTGATGTTSGCATTTTAGAG
12/12	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GGGTATTGTCWTCGTAGATAATG
13/13	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	TTATTGCTCTAGGATTGATGTT
14/14	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	GCATTTTAGAGSACGGGGGTATT
15/15	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	TCAAACCTAACCTTAAAGACAAC
16/16	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	TGAAACAGTGTTTACGGTACTCC
17/17	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATGATAATTCTGTATCGGTGCAA
18/18	<i>Haemophilus influenzae</i>	AGCAGAAGTTATTATGACTGTGC
19/19	<i>Haemophilus influenzae</i>	GACGATAACTCTTATAAAGTATC
20/20	<i>Haemophilus influenzae</i>	GATACCGATGACGGTACTGGTTTG
21/21	<i>Staphylococcus aureus</i>	AGTGTGGGAAATTGTCGATAATA
22/22	<i>Staphylococcus aureus</i>	TGAAGTTGTTATTGAAAAAGATAAC
23/23	<i>Staphylococcus aureus</i>	GGATTAAAGTAACGGATAACGGA
24/24	<i>Staphylococcus aureus</i>	CTGTCGAAGTTATTTAACTGTTT
25/25	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGACTTCAGAGAGAGGTTTGCAC
26/26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GAAATCAGCATCACCATCCATAC
27/27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATACGGATGAGTCGATCACTGTC
28/28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GACGACAACACCTACAAGGTGTC
29/29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GACACCGACGATGGCACCGGTCTG
30/30	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	TTCGACAACAACAGCTACAAAAT
31/31	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATATGGTGTTTGAAGTATTGGAC

32/32	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GACAAAATCACGGTAACGATACA
33/33	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GACAACAACAGCTACAAAATCTC
34/34	<i>Escherichia coli</i>	TATTCGAGGTGGTAGATAACGCT
35/35	<i>Escherichia coli</i>	TTCACGCCGATAACTCTGTCTCT
36/36	<i>Escherichia coli</i>	CGCCGATAACTCTGTCTCTGTAC
37/37	<i>Escherichia coli</i>	GACGATAACTCCTATAAAGTGTC
38/38	<i>Escherichia coli</i>	GACACGGATGACGGCACC GGCTCTG
39/39	<i>Moraxella catarrhalis</i>	AGCTGCCGAGGTTATTATGACGG
40/40	<i>Moraxella catarrhalis</i>	GATGATAATTCATACAAAGTATC
41/41	<i>Moraxella catarrhalis</i>	TGTGGATATCCACCCTGAAGAAG
42/42	<i>Moraxella catarrhalis</i>	ATACCGATGATGGTACAGGCTTG
43/43	<i>Legionella pneumophila</i>	GATGATAATTCCTACAAGGTATC
44/44	<i>Legionella pneumophila</i>	AGCAGCCGAAGTCATCATGACAG
45/45	<i>Legionella pneumophila</i>	TGTAGATATTCATAAAGAAGAAG
46/46	<i>Legionella pneumophila</i>	ATACAGATGATGGAACCGGTTTG
47/47	<i>Legionella pneumophila</i>	CAGATGATGGAACCGGTTTGCAT
48/48	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	CAACATCAGCCAGGGGATTACAT
49/49	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	GGAATTCAGTAGACATACATCC
50/50	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	TGAAAATGATAACTATAAAGTGTC

Taulukko 4B. ParE oligonukleotidisekvenssit

Oligonukleoti-

di/sekvenssinumero

	Spesifisyys (<i>parE</i> -geeni)	Sekvenssi (5'-3')
1/51	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGGTAACGAAATAGATGTAACAA
2/52	<i>Staphylococcus aureus</i>	AGAAGATAATGGACGTGGTATGC
3/53	<i>Staphylococcus aureus</i>	GTAAACCGACAGTCGAAGTTATC
4/54	<i>Staphylococcus aureus</i>	CAACTGATAAACGGGGATTACATC
5/55	<i>Staphylococcus aureus</i>	GGACAAGGCGGCTATAAACTTC
6/56	<i>Streptococcus pyogenes</i>	TGGAGATGATATTAAGGTTGTTA
7/57	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GTCAGTGTGGCAGATAGCGGACG
8/58	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GGATTCCCACCGTTCAAGTTATT
9/59	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CAACAGATGCTACGGGATTGCAC
10/60	<i>Streptococcus pyogenes</i>	GGTCAGGGTGGCTACAAAACGTC

11/61	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	TGGTGATCGTATTGATGTAAC TA
12/62	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CTAACGGTTCAAGACCATGGACG
13/63	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GAATTCCAAC TGTGAGGTTATC
14/64	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CGACCGATGGCGCTGGTCTTCAT
15/65	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GGTCAAGGTGGCTATAAGACATC
16/66	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	TGCTAATACTATTGCCGTTGTTT
17/67	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATAACTGTTAGTGACAACGGTCG
18/68	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	AGATTTCTACGATTGACACCGTC
19/69	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	GATAACGATTCTTATAAGATTGC

Esimerkki 4. Näyte-DNA:n monistus

Näyte-DNA:t bakteeriviljelmistä tai kliinisistä näytteistä monistettiin seuraavassa esitettyä yleistä menetelmää käyttäen.

- 5 Analysoitavasta näytteestä (bakteeriviljelelmä tai kliininen näyte) eristetään DNA käyttäen QIAamp DNA Mini-kittiä (Qiagen, Saksa). Kun DNA on eristetty, monistetaan halutulta DNA-alueelta hybridisaatioon käytettävä kohdejuoste epäsymmetristä polymeraasiketjureaktiota (PCR) käyttäen. Monistuksen ensimmäisessä vaiheessa valmistetaan reaktioseos sekoittamalla näytteistä
- 10 eristetty DNA, esimerkissä 1 valmistetut universaalit gB1F- ja gB2R-alukeseokset sekä monistukseen tarvittavat muut komponentit keskenään.

- PCR:ssä 25 µl:n reaktioseos sisältää 32 pmol gB2r-alukeseosta, 8 pmol gB1F-alukeseosta, 200 µM kutakin dATP, dGTP ja dTTP sekä 140 µM dCTP (Sigma, USA), 1 x Hot Start Taq PCR -puskuria (Qiagen, Saksa), johon
- 15 lisätty MgCl₂:a siten, että lopullinen konsentraatio on 2,8 mM, 25 nmol Cy5-AP3-dCTP:tä (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 7,5 % DMSO:ta (Amersham Pharmacia Biotech, USA), 2,5 U Hot Start Taq DNA-polymeraasia (Qiagen, Saksa) ja 2,5 µl eristettyä DNA:ta.

- PCR-reaktio suoritetaan GenAmp PCR system 2700 -PCR-
- 20 laitteessa (Applied Biosystems, Yhdysvallat). PCR-laitteessa käytetty lämpöohjelma oli seuraavanlainen: 15 min alkudenturaatio lämpötilassa 95 °C, 40 sykliä 1 min lämpötilassa 95 °C, 1 min lämpötilassa 50 °C, 1 min lämpötilassa 72 °C, sekä 10 min loppupidennys lämpötilassa 72 °C. Kun PCR reaktio on valmis, monistumisen onnistuminen tarkastetaan geelielektroforeesilla 2-%:isessa
- 25 agarosigeelissä, joka sisältää etidiumbromidia. Tämän jälkeen Cy5-leimattu PCR-tuote puhdistetaan poistamalla reaktioseoksesta ylimääräiset alukkeet,

nukleotidit, puskuri ja polymeraasientsyymi QIAquick-PCR-puhdistuskitillä (Qiagen, Saksa).

Esimerkki 5. Näytesirujen valmistus ja toiminta

Esimerkissä 3 valmistetut 5'-päästään aminoidut oligonukleotidi-
 5 koettimet liuotettiin 400 mM natriumkarbonattipuskuriin (pH 9,0) siten, että lopulliseksi pitoisuudeksi tuli 50 μ M. Koettimet kiinnitettiin kovalenttisesti aminosilaanilla päällystetyille mikroskooppilaseille (Genorama, Asper Biotech Ltd., Eesti). Koettimien siirtäminen lasille tehtiin tätä tarkoitusta varten kehitetyllä robotilla (OmniGrid, GeneMachines, USA) ja neuloilla (Telechem SMP3, USA).
 10 Yhden printatun koetinalueen keskimääräinen koko oli 120 μ m. Laseille printattiin lisäksi positiivisiksi kontrolleiksi 5'-päästä aminoidut PCR-alukkeet. Printauksen jälkeen koetinlaseja pidettiin tunnin ajan ammoniakkihöyryssä koettimien kiinnittämiseksi lasille. Ammoniakkikäsittelyn jälkeen lasit huuhdeltiin kolmeen kertaan tislatussa vedessä ja niiden annettiin kuivua.

15 Seuraavaksi esimerkissä 4 valmistettu Cy5-leimattu kohdejuoste hybridisoitiin mikroskooppilasille, johon koettimet oli kiinnitetty. Hybridisaatio-reaktioseos sisälsi n. 200 - 300 ng kohdejuostetta, 20 x SSC:ta (1 μ l 20xSSC sisältää 175,3 g NaCl:a ja 88,2 g natriumsitraattia, pH säädetään 7.0 HCl:lla; lopullinen konsentraatio 3,4x), 20 % natriumsodekyyilisulfaattia (SDS) (lopullinen konsentraatio 0,3 %) ja steriiliä vettä siten, että hybridisaatioreaktioseoksen tilavuudeksi saatiin 37 μ l. Hybridisaatio aloitettiin denaturaatiolla lämpötilassa 95 °C 3 min. Tämän jälkeen putket jäähdytettiin nopeasti jäällä. Kun seos oli jäähtynyt, se pipetoitiin koetinlasille ja peitettiin peitinlasilla. Koetinlasi asetettiin hybridisaatiokasetin (ArrayIt, TeleChem International, USA) sisälle ja kasetti suljettiin tiiviisti. Kasetti upotettiin vesihauteeseen, jonka lämpötila oli 57 °C ja laseja hybridisoitiin 12 -16 tuntia.

Hybridisaation jälkeen hybridisoimattomat tuotteet pestiin pois lasilta seuraavasti: 5 min lämpötilassa 57 °C 0,1-%:isella SDS:llä vedessä, 5 min huoneenlämmössä 01-%:isella SDS:llä 0,5 x SSC:ssä ja 5 min huoneenlämmössä 0,06 x SSC:llä.
 30

Kun lasit olivat kuivuneet, ne analysoitiin lukijalaitteella (Agilent DNA Microarray Scanner, Agilent, USA). Jos Cy5-leimattu kohdejuoste oli sitoutunut yhteen tai useampaan lasilla olevaan koettimeen, näiden koetintäplien kohdalla nähtiin fluoresoiva signaali. Koska koetinlasit sisälsivät myös positiivisen
 35 kontrollin, saatiin hybridisaation toimivuuden varmistava fluoresoiva signaali, vaikka näyte ei olisikaan sisältänyt bakteeria.

Kuviossa 2 on esitetty esimerkki hybridisaatiosta. Hybridisoitavana kohdejuosteena oli *Staphylococcus aureus* -puhdasviljelmästä eristetyn DNA:n *gyrB* monistuma (epäsymmetrinen Cy-5-leimattu PCR-tuote). Esimerkkilasi sisälsi neljä *Staphylococcus aureus* bakteerille spesifistä *gyrB*-aluketta (taulukko 5 4B: alukkeet 22 - 25), jotka kaikki sitoivat spesifisesti *Staphylococcus aureus* -kohdejuostetta. Signaalin antoivat lisäksi positiiviset kontrollit, joita oli yhteensä 5 kpl.

Esimerkki 6. Potilasnäytteiden analysointi

Kliinisistä näytteistä, jotka oli saatu hengitystieinfektiosta kärsiviltä potilailta, eristettiin ja monistettiin DNA esimerkissä 4 kuvatulla tavalla ja testattiin käyttäen esimerkissä 5 kuvattua koetinlasia, johon oli kiinnitetty taulukoissa 4A ja 4B luetellut koettimet sekä positiivisina kontrolleina toimivat PCR-alukkeet.

Samat näytteet analysoitiin yleis-bakteeri-PCR:ään pohjautuvalla menetelmällä oleellisesti kuten Nikkari *et al.* (Emerging Infectious Diseases, vol 8, nro 2, 2002, s.188 - 194) ja Kotilainen *et al.* (Journal of Clinical Microbiology, vol 36, nro 8, 1998, s. 2205 - 2209) ovat kuvanneet. Yleis-bakteeri-PCR-menetelmässä alukkeina käytettiin universaaleja 16S rRNA -geenialueelle sijoittuvia alukkeita, jotka edellä mainituissa julkaisuissa on nimetty fD1mod- ja 16S1RR-B-nimisiksi. PCR-tuote kloonattiin ja sekvensoitiin. Saatua DNA-sekvenssiä verrattiin sekvenssitietokantoihin (GenBank) ja bakteeri tunnistettiin vertailun perusteella. Tulokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukosta 5 käy ilmi, että keksinnön mukaisella menetelmällä saadut tulokset ovat täysin identtiset tunnetun tekniikan mukaiseen yleis-bakteeri-PCR-menetelmään verrattuna. Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä on kuitenkin oleellisesti nopeampi suorittaa, sillä tulos saadaan noin vuorokaudessa. Sen sijaan yleis-bakteeri-PCR:n suorittamiseen kuluu aikaa keskimäärin noin viikko kloonamiseen ja sekvensointiin tarvittavien aikaa vaativien työvaiheiden takia. Verrattuna viljelyyn sekä keksinnön mukainen menetelmä että yleis-bakteeri-PCR osoittautuivat yhtä herkiksi ja muutamassa tapauksessa jopa viljelyä herkemmiä menetelmiksi.

Taulukko 5. Potilasnäytteillä suoritettu menetelmävertailu.

Kliininen kuva	Näyte	Viljelytulos	Yleis-bakteeri-PCR	Keksinnön menetelmä
Nielurisa-tulehdus	Kudospala	ei tiedossa	F.N.	F.N.
Keuhkokuume 1)	Yskös	ei viljelty	ei tiedossa	S.P.
Välikorva-tulehdus	Märkänäyte	H.I.	H.I. ja M.C.	H.I. ja M.C.
Välikorva-tulehdus	Märkänäyte	S.P.	S.P.	S.P.
Välikorva-tulehdus	Märkänäyte	negatiivinen	H.I.	H.I.
Välikorva-tulehdus	Märkänäyte	H.I.	H.I.	H.I.
Välikorva-tulehdus	Märkänäyte	H.I., S.P.	H.I., M.C. ja S.P.	H.I., M.C. ja S.P.
Poskiontelo-tulehdus	Märkänäyte	H.I.	H.I.	H.I.
Poskiontelo-tulehdus	Märkänäyte	negatiivinen	H.I.	H.I.

F.N. = *Fusobacterium necrophorum*

S.P. = *Streptococcus pneumoniae*

H.I. = *Haemophilus influenzae*

M.C. = *Moraxella catarrhalis*

- 5
- 1) Keuhkokuumepotilaasta ei tehty bakteeriviljelyä eikä yleis-bakteeri-PCR:ää, mutta keksinnön mukaisella menetelmällä saatu tulos *Streptococcus pneumoniae* -bakteerista sopii hyvin yhteen kliinisen kuvan kanssa, sillä kyseinen bakteeri on yksi yleisimmistä keuhkokuumeen aiheuttajista.
- 10

Esimerkki 7. Keksinnön mukaisen menetelmän vertailu tunnetun tekniikan mukaiseen, spesifisiä oligonukleotideja hyväksi käyttävään menetelmään

Monien bakteeripatogeenien tunnistusta häiritsevät normaaliflooran bakteerit. Näiden bakteerien olemassaolo on välttämätön terveelle elimistölle ja on arvioitu, että ihmisen normaaliflooraan kuuluu satoja erilaisia bakteereja. Normaaliflooran bakteerit voivat monessa tapauksessa häiritä myös bakteeridiagnostiikkaa.

Esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän, jossa käytetään spesifisiä *gyrB/parE*-oligonukleotidikoettimia, spesifisyyttä normaaliflooran suhteen tutkittiin ja samalla verrattiin multiplex-PCR-menetelmään, jossa monistamiseen käytetään universaalien ja bakteerilajispesifisten alukkeiden seosta.

Normaaliflooran bakteerilajien *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Moraxella caviae* ja *Moraxella cuniculi* bakteeripuhdasviljelmistä eristettiin ja monistettiin DNA esimerkissä 4 kuvatulla tavalla ja testattiin käyttäen esimerkissä 5 kuvattua koetinlasia, johon oli kiinnitetty spesifiset koettimet (esitetty taulukoissa 4A ja 4B). Vertailun vuoksi syntetisoitiin julkaisussa Hendolin *et al.* (Journal of Clinical Microbiology, 35; 11, 1997) kuvatut spesifiset PCR-alukkeet ja multiplex-PCR suoritettiin julkaisussa kuvatulla tavalla. Tunnetussa multiplex-PCR-menetelmässä toisena PCR-alukkeena käytetään universaalia 16S-rRNA:n konservoituneelle geenialueelle sijoittuvaa aluketta ja toisena PCR-alukkeena alukeseosta, joka koostuu neljälle eri bakteerilajille spesifisistä alukkeista. Bakteerilajit, joita kyseisellä alukeparilla pyrittiin diagnosoimaan, olivat *Alloiococcus otitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ja *Streptococcus pneumoniae*. Bakteerilajispesifiset alukkeet oli suunniteltu siten, että syntyvä PCR-tuote on eripituinen riippuen siitä, mistä bakteerilajista se on peräisin. Tulokset esitetty taulukossa 6.

Tulokset osoittavat, että esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä, jossa käytetään spesifisiä oligonukleotidikoettimia, tunnistaa spesifisesti vain halutut bakteerit. Sen sijaan tunnetun tekniikan mukaiset, spesifisiksi määritet alukkeet ja multiplex-PCR-menetelmä ei erota haluttuja bakteereja tutkituista normaaliflooran bakteereista, eivätkä ne siis ole halutun spesifisiä (kuviokuva 3).

Taulukko 6 Keksinnön mukaisen menetelmän ja multiplex-PCR-menetelmän vertailu

Bakteerilaji	*) Koettimet, joihin sitoutumista tapahtui (spesifisyys)	Multiplex-PCR-tulos
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4B: 10 - 14 (<i>Strep.pneu</i>) 4A: 1 - 4 (<i>Strep.pneu</i>)	Monistui <i>Strep.pneu</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4B: 5 - 9 (<i>Strep.pyo</i>) 4A: 5 - 7 (<i>Strep. pyo</i>)	Ei monistunut <i>Strep.pneu</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Streptococcus oralis</i>	Ei sitoutumista	Monistui <i>Strep.pneu</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Streptococcus mitis</i>	Ei sitoutumista	Monistui <i>Strep.pneu</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Moraxella catarrhalis</i>	4A: 39 - 42 (<i>Morax. catarr</i>)	Monistui <i>Morax. cat.</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Moraxella cuniculi</i>	Ei sitoutumista	Monistui <i>Morax. cat.</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Moraxella caviae</i>	Ei sitoutumista	Monistui <i>Morax. cat.</i> spesifisillä alukkeilla
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	4A: 30 - 33 (<i>Neisseria gon.</i>)	Ei monistunut <i>Morax. cat.</i> spesifisillä alukkeilla

- 5 *) 4A tarkoittaa taulukkoa 4A ja 4B taulukkoa 4B. Numerot (esim. 10 - 14) viittavat oligonukleotidien numeroihin edellä mainituissa taulukoissa. Spesifisyys ilmaisee mille bakteerilajille kyseiset oligonukleotidikoettimet on suunniteltu.

Patenttivaatimukset

1. Oligonukleotidikoetinsekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se hybridisoituu normaaleissa hybridisaatio-olosuhteissa infektioita, erityisesti hengitystieinfektioita, aiheuttavien bakteerien topoisomeraaseja, erityisesti
5 GyrB- ja/tai ParE-proteiineja, koodaavien geenien konservoituneiden alueiden lähellä olevan hypervarioivan alueen sekvenssin kanssa ja joka on bakteerilajispesifinen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen oligonukleotidikoetinsekvenssi, t u n n e t t u siitä, että mainittu hypervarioiva alue on bakteerin *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila* ja *Fusobacterium necrophorum* gyraasia tai parE-proteiinia koodaavan geenin hypervarioivan alueen sekvenssi.
10

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen oligonukleotidikoetinsekvenssi, t u n n e t t u siitä, että sen pituus on 15 - 30, edullisemmin 20 - 30 ja edullisimmin 21 - 25 nukleiinihappoa.
15

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen oligonukleotidikoetinsekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää jonkin sekvensseistä sekvenssitunnusnumerot 1 - 69 mukaisen sekvenssin tai sen kanssa käänteisen ja
20 komplementaarisen sekvenssin tai näiden toiminnallisen fragmentin.

5. Oligonukleotidikoetinseos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää minkä tahansa yhdistelmän sekvensseistä, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69, ja/tai näiden kanssa käänteisistä ja komplementaarista sekvensseistä
25 ja/tai näiden toiminnallisista fragmenteista.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen oligonukleotidikoetinseos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kaikki sekvenssit, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen oligonukleotidikoetinseos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kaikki sekvensseille, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69, käänteiset ja komplementaariset sekvenssit.
30

8. Jonkin patenttivaatimuksista 5 - 7 mukainen oligonukleotidikoetinseos, t u n n e t t u siitä, että mainittu koetinseos on kiinnitetty kiinteälle kantajalle, edullisesti käsitellylle lasille.

9. DNA-alukeseos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sekvenssejä, jotka hybridisoituvat hengitystieinfektioita aiheuttavien bakteerien topoisome-
35

raaseja koodaavien, erityisesti GyrB- ja/tai ParE-proteiinia koodaavien geenien, konservoituneiden alueiden sekvenssien kanssa ja jotka käsittävät sekvenssit tunnusnumerot 76 ja 77 mukaiset sekvenssit tai niiden kanssa komplementaariset sekvenssit tai näiden toiminnalliset fragmentit.

5 10. Diagnostinen menetelmä hengitystieinfektioita aiheuttavan bakteerin osoittamiseksi ja tunnistamiseksi kliinisestä näytteestä, t u n n e t t u siitä, että

a) kliinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan käyttäen patenttivaatimuksessa 9 määriteltyä alukeseosta,

10 b) monistettu DNA saatetaan kosketukseen halutun yhdistelmän kanssa missä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 4 määriteltyjä oligonukleotidikoettimia hybridisaatio-olosuhteissa ja

c) todetaan mahdollinen hybridisaatiokompleksin muodostuminen.

15 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen diagnostinen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) kliinisestä näytteestä eristetty DNA monistetaan polymeerasiketjureaktiota käyttäen ja että vaiheessa b) monistettu DNA saatetaan kosketukseen kiinteälle kantajalle kiinnitettyjen bakteerilajispesifisten oligonukleotidikoettimien kanssa.

20 12. Patenttivaatimuksen 10 tai 11 mukainen diagnostinen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa a) kliinisestä näytteestä eristetyn DNA:n monistuksessa käytetään sopivasti leimattua nukleotidia todettavissa olevan kohdejuosteen aikaansaamiseksi.

25 13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen diagnostinen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b) monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteään kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty kaikki keksinnön mukaiset lajispesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on sekvenssitunnusnumerot 1 - 69, tai niiden käänteiset ja komplementaariset sekvenssit.

30 14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen diagnostinen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b) monistettu ja mahdollisesti leimattu kohde-DNA saatetaan kosketukseen kiinteään kantajan, edullisesti käsitellyn lasin, kanssa, jolle on kiinnitetty keksinnön mukaiset tietyille tai muutamalle hengitystieinfektioita aiheuttavalle bakteerille spesifiset oligonukleotidikoettimet, joilla on taulukoissa 4A ja 4B annetut vastaavat sekvenssitunnusnumerot, tai niiden
35 komplementaariset sekvenssit.

15. Jonkin patenttivaatimuksen 10 - 14 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa c) käytetään mikrosirutekniikkaa.

16. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukaisten oligonukleotidikoetinsekvenssien tai jonkin patenttivaatimuksista 5 - 8 mukaisen oligonukleotidikoetinseoksen käyttö bakteerien toteamiseen, tunnistamiseen tai luokitte-
luun.

17. Topoisomeraasigeenien konservoitujen alueiden sekvenssien ja konservoituneiden alueiden sekvenssien käyttö bakteeridiagnostiikassa alkukeina tai hybridisaatiokoettimina.

Tiivistelmä

Keksintö koskee nukleiinihappokoettimia ja universaaleja alukkeita, jotka ovat käyttökelpoisia bakteerien tunnistamisessa ja bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosimisessa. Erityisesti keksintö koskee spesifisiä nukleiinihappokoettimia, jotka ovat peräisin infektoita aiheuttavien bakteerien topoisomeraasigeenin konservoituneiden alueiden lähellä olevilta hypervarioivilta alueilta. Keksintö koskee myös universaaleja alukkeita, jotka ovat peräisin topoisomeraasigeenin konservoituneilta alueilta. Lisäksi keksintö koskee näiden nukleiinihappokoettimien ja universaalien alukkeiden käyttöä bakteerien aiheuttamien infektioiden diagnosoinnissa sekä diagnostisia menetelmiä, joissa käytetään näitä nukleiinihappokoettimia ja universaaleja alukkeita.

L 5

Kuvio 1.

A. *Haemophilus influenzae* *gyrB*-monistustuote ja koettimien sijainti.

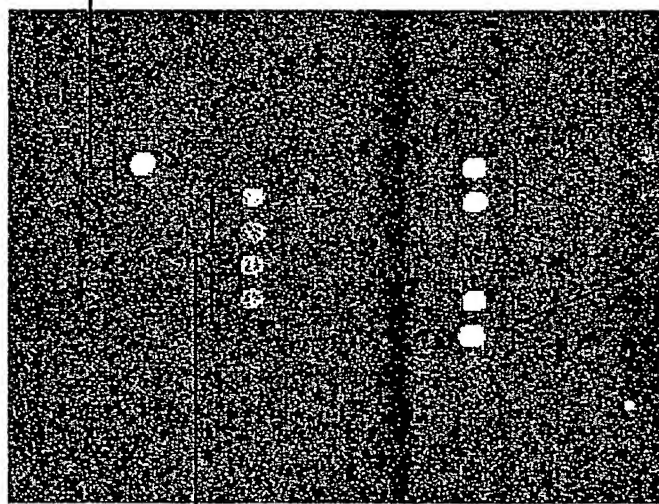
5' cgtcctgggtatgtatatcggg²¹cgataccgatgacgggtactggtttcacc
atatgggtatttgaagtgggtggataatgccattgatgaagccctcgctggcc
attgttccgatattatcgtgacaattcacgatgataattctgtatcgggtgcaa¹⁸
gatgatggggggcgggattcctgtggatattcatcctgaagaaggcgtttct
¹⁹gcagcagaagttattatgactgtgcttcacgcaggcggtaaatttgacga
²⁰aactcttataaagtatcgggcgggtttacacggcgtggg-3'

B. *Moraxella catarrhalis* *gyrB*-monistustuote ja koettimien sijainti.

5' cgaccagggatgtatattgggt⁴³gataccgatgatggtacaggcttgca
ccatatgggtgtttgaggtgggtggatatgccattgatgaggcattggcaggtc
actgtgatgagattaatattatcgtccatgacgatgaatctgtttcgggtgatg
gagtatgggcgtgggtattcctgtggatatccaccctgaagaagggtgtatc⁴²
⁴⁰agctgccgaggttattatgacgggtgcttcacgcaggcggtaaatttgatgat
⁴¹aattcatacaaagtatctgggggcctgcacggcgtagg-3'

Kuvio 2

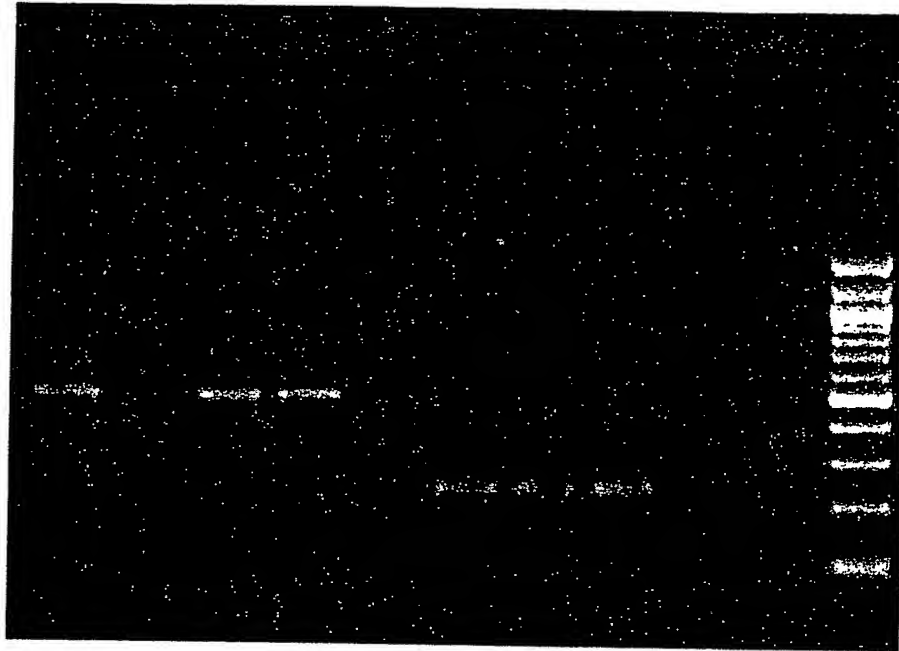
Positiivinen kontrolli



Positiiviset kontrollit

Staphylococcus aureus -positiiviset *gyrB*-
oligonukleotidit (4 kpl, taulukko 4B: oligonukleotidit 21 - 24).

Kuvio 3



1. *Streptococcus pneumoniae*
2. *Streptococcus pyogenes*
3. *Streptococcus oralis*
4. *Streptococcus mitis*
5. Negatiivinen kontrolli
6. *Moraxella catarrhalis*
7. *Moraxella cuniculi*
8. *Moraxella caviae*
9. *Neisseria gonorrhoeae*
10. Negatiivinen kontrolli
11. Kokomarkkeri

2022264.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> MoBiDiag Oy

<120> Nukleiinihappokoettimia, universaaleja alukkeita ja menetelmiä, joissa niitä käytetään

<130> 2022264FI

<160> 77

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1

ctcaaaagaa ggtcttcacc atc

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2

gccatattca agttttttatt gag

23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 3

agccagatga ttcgattact gtt

23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4

ttgagaccgt ctttacagtc ctt

23

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 5

gttttgccctc tcatattaaa gtc

23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 6

tcctttattga agcagataat tcc

23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 7

cgttgaaaca gtttttacag tct

23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 8
ggctcttcac atctagtcta tga

23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 9
ggttgtagac wacagcattg acg

23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 10
agccatggca gsttattgct cta

23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 11
ggattgatgt tsgcatttta gag

23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 12
gggtattgtc wtcgtagata atg

23

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Chlamydia pneumoniae

<400> 13
 ttattgctct aggattgatg tt 22

<210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Chlamydia pneumoniae

<400> 14
 gcattttaga gsacgggggt att 23

<210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 15
 tcaaactaac ccttaaagac aact 24

<210> 16
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 16
 tgaaacagtg tttacggtag tcc 23

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Haemophilus influenzae

<400> 17
atgataattc tgtatcgggtg caa

23

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 18
agcagaagtt attatgactg tgc

23

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 19
gacgataact cttataaagt atc

23

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 20
gataccgatg acggtactgg tttg

24

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 21
agtgtgggaa attgtcgata ata

23

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 22

tgaagttggtt attgaaaaag ataac

25

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 23

ggattaaagt aacggataac gga

23

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 24

ctgtcgaagt tattttaact gttt

24

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 25

cgacttcaga gagaggtttg cac

23

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 26
gaaatcagca tcaccatcca tac 23

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 27
atacggatga gtcgatcact gtc 23

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 28
gacgacaaca cctacaaggt gtc 23

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 29
gacaccgacg atggcaccgg tctg 24

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 30
ttcgacaaca acagctacaa aat 23

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 31

atatggtggt tgaagtattg gac

23

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 32

gacaaaatca cggtaacgat aca

23

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 33

gacaacaaca gctacaaaat ctc

23

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 34

tattcgaggt ggtagataac gct

23

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 35

ttcacgccga taactctgtc tct

23

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 36

cgccgataac tctgtctctg tac

23

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 37

gacgataact cctataaagt gtc

23

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 38

gacacggatg acggcaccgg tctg

24

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 39

agctgccgag gttattatga cgg

23

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 40
gatgataatt catacaaagt atc 23

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 41
tgtggatatc caccctgaag aag 23

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 42
ataccgatga tgggtacaggc ttg 23

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 43
gatgataatt cctacaaggt atc 23

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 44
agcagccgaa gtcacatcatga cag 23

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 45

tgtagatatt cataaagaag aag

23

<210> 46

<211> 23

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 46

atacagatga tggaaccggt ttg

23

<210> 47

<211> 23

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 47

cagatgatgg aaccggtttg cat

23

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Fusobacterium necrophorum

<400> 48

caacatcagc caggggatta cat

23

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Fusobacterium necrophorum

<400> 49
ggaattccag tagacataca tcc 23

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Fusobacterium necrophorum

<400> 50
tgaaaatgat aactataaag tgtc 24

<210> 51

<211> 23

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 51
cggtaacgaa atagatgtaa caa 23

<210> 52

<211> 23

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 52
agaagataat ggacgtggta tgc 23

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 53
gtaaaccgac agtcgaagtt atc 23

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 54

caactgataa acggggatta catc

24

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 55

ggacaaggcg gctataaaac ttc

23

<210> 56

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 56

tggagatgat attaaggttg tta

23

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 57

gtcagtgtgg cagatagcgg acg

23

<210> 58

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 58
ggattccac cgttcaagtt att

23

<210> 59

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 59
caacagatgc tacgggattg cac

23

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 60
ggtcagggtg gctacaaaac gtc

23

<210> 61

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 61
tggtgatcgt attgatgtaa cta

23

<210> 62

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 62
ctaacgggtc aagaccatgg acg

23

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 63

gaattccaac tggtgaggtt atc

23

<210> 64

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 64

cgaccgatgg cgctgggtctt cat

23

<210> 65

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 65

ggtcaagggtg gctataagac atc

23

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 66

tgctaatact attgccgttg ttt

23

<210> 67

<211> 23

<212> DNA

<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 67

ataactgtta gtgacaacgg tcg

23

<210> 68

<211> 23

<212> DNA

<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 68

agatttctac gattgacacc gtc

23

<210> 69

<211> 23

<212> DNA

<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 69

gataacgatt cttataagat tgc

23

<210> 70

<211> 294

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 70

cgaccaggga tgtatattgg tgataccgat gatggtacag gcttgcacca tatggtgttt 60

gaggtggtgg ataatgccat tgatgaggca ttggcaggtc actgtgatga gattaatatt 120

atcgtccatg acgatgaatc tgtttcgggtg atggactatg ggcgtggtat tcctgtggat 180

atccaccctg aagaagggtgt atcagctgcc gaggttatta tgacgggtgct tcatgcaggc 240

ggtaaatttg atgataattc atacaaagta tctggggggcc tgcacggcgt agga 294

<210> 71

<211> 257

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> 71

2022264.ST25.txt

```

ggggatacag atgatggaac cggtttgcac cacatgggtt ttgagggttg agataattca    60
atagatgagt ctctggcagg atattgcaag gaaatttttg ttaccatcca tagcgatgag    120
tcaattacag ttaaggacga tggccgtggt attcctgtag atattcataa agaagaaggc    180
aaatcagcag ccgaagtcac catgacagtc ctacatgctg gaggtaaatt tgatgataat    240
tcctacaagg tatctgg                                     257

```

<210> 72

<211> 290

<212> DNA

<213> *Fusobacterium necrophorum*

<400> 72

```

cgcccagggg tgtacatcgg aacaacatca gccaggggat tacatcattt agtatgggaa    60
gtggtagata attctgtgga tgaagcattt gctgggtatt gtaataggat tactgtaagt    120
attttgctg ataacattat tcaagtagag gataatggaa gaggaattcc agtagacata    180
catccaaaat atggaaaatc cgctttggaa attgtattga cggattaca tgctggggga    240
aaatttgaaa atgataacta taaagtgtca ggtggactgc acggagttgg                290

```

<210> 73

<211> 291

<212> DNA

<213> *Streptococcus mitis*

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n is a, t, c, or g

<220>

<221> misc_feature

<222> (288)..(288)

<223> n is a, t, c, or g

<400> 73

2022264.ST25.txt

```

agtccccgga tgtacatngg gtcaacttca aaagaaggtc ttcaccatct agtctgggaa      60
attgttgata actcaattga cgaggccttg gcaggatttg ctagccatat tcaagtcttt      120
attgagccag ataattcgat tacagttggt gatgatggac gtggtatccc agtcgatatt      180
caggaaaaaa caggtcgacc tgccgttgag actgtcttta ctgttcttca cgctggagga      240
aagtttggcg gtggcggata taaggtctca gacggtcttc atggcgtnng a                291

```

<210> 74

<211> 288

<212> DNA

<213> Streptococcus oralis

```

<400> 74
agaccgggga tgtatattgg atcgaccgac ggtgctggtc tccatcatct agtctgggaa      60
atcgctggata atgcggttga cgaagccttg tctggatttg gtgatcgcat cgatgtgacg      120
attaataagg acgggagttt aacggttcaa gaccacggac gtgggatgcc aacgggaatg      180
cacgccatgg gaattccaac tgttgaagtt atctttacca ttctccacgc tggagggaaa      240
ttcgggtcaag gtggctataa gacatctggt ggtctgcatg gggttgga                288

```

<210> 75

<211> 294

<212> DNA

<213> Haemophilus parainfluenzae

```

<400> 75
agaccgggga tgtatatcgg ggataccgat gatggaacag gcctacacca tatggtgttt      60
gaggtggttg ataacgctat cgatgaagcg cttgctggct attgttccga tattatcgtc      120
actattcatg atgataattc tgtttccgta caagatgacg gccgcgggat tccggtagat      180
attcaccag aagaaggggt ttctgcggca gaagcaatca tgacagtact tcacgcaggt      240
ggtaaattcg atgataactc ttataaagta tcagggggac tacacggcgt tgga                294

```

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> w is a or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> k is g or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> y is c or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> h is a, c or t

<400> 76

cgtccwggka tgtayathgg

20

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> h is a, c or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> r is a or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> r is a or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> w is a or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> w is a or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> d is a, g or t

<400> 77

cchacrcrct gwaawccdcc

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.